

BREVET D'INVENTION

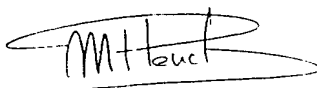
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 SEP. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 01
Téléfax : 01 42 93 59 30

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-447 DU 19 AVRIL 1951

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Ces informations sont à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 20 OCT. 1997 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 97 13115 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 20 OCT. 1997		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS n° du pouvoir permanent : D.59190 références du correspondant : téléphone :									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° : date :		Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) Moyens de documentation de répertoires en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties activatrices ou non inhibitrices d'immunorécepteurs NKR									
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN : code APE/NAF : Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)		Forme juridique :									
Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 101 Rue de Tolbiac 75654 PARIS CEDEX 13		Pays FRANCE									
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : indiquer copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° : date : n° : date :											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) Mandataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI									

Moyens de documentation de répertoires
en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs
contreparties activatrices ou non inhibitrices
d'immunorécepteurs NKR

5

La présente invention concerne des moyens permettant de documenter les répertoires d'un individu humain ou animal en immunorécepteurs NKR (*Natural Killer Receptor*) du type des immunoglobulines ou du type des lectines, et en
10 immunorécepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, d'immunorécepteurs NKR. Elle vise également leurs applications biologiques.

Les fonctions immunitaires d'un homme ou d'un animal
15 sont définies par plusieurs catégories de molécules hautement diversifiées, telles que notamment le système des groupes sanguins ABO, la famille des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, appelé chez l'homme, système HLA -*Human Leukocyte Antigen*-), la famille des
20 récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR). L'ensemble des molécules qu'un individu adulte exprime, ou est capable d'exprimer, pour chacune de ces différentes familles constitue, exception faite des vrais jumeaux, un répertoire évolutif qui lui est
25 propre et qui intervient dans la reconnaissance du soi ou du non-soi.

D'autres grands répertoires ont été plus récemment identifiés. Il s'agit du répertoire en récepteurs NKR de
30 type immunoglobuline et du répertoire en récepteurs NKR de type lectine. Les récepteurs NKR de type immunoglobuline comprennent les récepteurs KIR (*Killer cell Inhibitory Receptor*) tels que notamment les récepteurs p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH. Les récepteurs NKR de type lectine
35 ~~comprennent les récepteurs inhibiteurs NKG2 tels que~~

qu'il considère alors comme non-soi par exemple, des cellules cancéreuses ou infectées, ou bien encore des cellules de greffe ou transplantation allo- ou xéno-génique.

5 Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent en effet aux réactions entre hôte et greffon lors d'une greffe (ou transplantation) de cellules, tissu ou organe qui présente(nt) un certain degré d'incompatibilité antigénique avec l'hôte. L'implication de récepteurs NKR et
10 de leurs contreparties dans la tolérance envers des greffes incompatibles, et dans l'effet sélectif de lyse de cellules malignes parfois observé après greffe de moelle osseuse, ou effet GVL (*Graft Versus Leukemia*), a en effet été démontrée *in vivo* (cf. Cambiaggi et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci.
15 USA, vol. 94, p. 8088-8092 ; Albi et al. 1996, Blood, vol. 87, n°9, p. 3993-4000).

Or, les moyens pouvant actuellement être mis en oeuvre dans un contexte médical ne permettent pas de documenter l'ensemble des répertoires d'un patient, d'un organe, d'un
20 tissu ou de cellules.

C'est ainsi qu'actuellement, seule la compatibilité des molécules HLA-A, HLA-B et HLA-DR du donneur et du receveur est vérifiée préalablement à une greffe ou transplantation allo- ou xéno-génique. Ces critères de
25 compatibilité n'apparaissent toutefois pas comme suffisants. Des traitements immunosuppresseurs (par exemple, à base de cyclosporine) doivent compléter ces procédures de greffe ou transplantation de manière à inhiber le système immunitaire du patient. De tels
30 traitements sont à hauts risques pour le patient qui est alors susceptible de développer des infections opportunistes. Ces traitements immunosuppresseurs doivent de plus être maintenus à un certain niveau pendant plusieurs années, et le patient doit alors résister aux effets
~~35 délétères des médicaments. Finalement, la réussite de~~
telles procédures de greffe ou transplantation reste

homologie, en particulier au niveau extracytoplasmique, entre un récepteur NKR et un récepteur contrepartie de ce NKR (e.g. jusqu'à 96% d'homologie entre KIR et KAR), l'utilisation d'anticorps ne permet en effet souvent pas de discriminer entre des NKR qui sont inhibiteurs et leurs contreparties à fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices. Les amorces oligonucléotidiques actuellement disponibles ne permettent quant à elles pas la mise en oeuvre d'une amplification en chaîne par polymérase capable de discriminer entre par exemple un NKR p58.1 et un NKR p58.2, ou entre un NKR p70.INH et un NKR p140.INH. Finalement, pour documenter précisément le répertoire en immunorécepteurs NKR et en leurs contreparties, il faut actuellement avoir recours après une étape de purification des récepteurs visés (e.g. par FACScan), à une étape de séquençage nucléotidique. La documentation du répertoire NKR /contreparties de NKR n'est donc actuellement pas réalisable en routine dans un contexte de type médical. Le niveau de stimulation et d'inhibition des programmes d'activation des cellules NK et T, et donc le potentiel de résistance d'un individu vis-à-vis du développement d'infections microbiennes ou parasitaires, de maladies auto-immunes, ou bien encore de cellules malignes, ne peut donc être mesuré. Il résulte également de cette absence de moyens adaptés pour la documentation des répertoires NKR/contreparties de NKR que les effets sélectifs de type GVL ne peuvent être utilisés en thérapie, et que les réactions GVH ou de rejets lors de greffes ou de transplantations allo- ou xéno-géniques ne peuvent être complètement écartées.

La présente invention propose donc des moyens permettant de documenter, pour un échantillon biologique donné, les répertoires en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties activatrices ou à tout le moins non inhibitrices de récepteurs NKR. Ces moyens permettent notamment de distinguer aisément entre un

récepteur cible,

ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNC d'un échantillon biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNC de l'échantillon biologique, et

iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNC et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

Par contrepartie fonctionnelle d'un récepteur, nous entendons dans la présente demande un récepteur à structure homologue, en particulier au niveau extracytoplasmique, mais à fonction différente : par exemple, une contrepartie fonctionnelle du récepteur NKR p58.1 est le récepteur contrepartie de NKR p50.1, et réciproquement; de même le récepteur NKR p58.2 et le récepteur contrepartie de NKR p50.2 sont l'un pour l'autre des contreparties fonctionnelles.

La présente méthode permet donc notamment de distinguer un récepteur NKR (ou contrepartie de NKR) d'un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur.

La (ou les) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' est (sont) en particulier capables de borner, sur l'ADN ou l'ADNC d'un récepteur cible qui leur correspond, une séquence d'oligonucléotides (bornes incluses) qui est absente de la séquence ADN ou ADNC d'un récepteur avec lequel elle(s) est (sont) capable(s) de ne pas s'hybrider

l'ADNc d'un récepteur p70.ACT (ou respectivement p70.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH ou p140.ACT.

- 5 Selon une quatrième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur
- 10 p140.INH (ou p140.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.ACT (ou respectivement p140.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH ou p70.ACT.
- 15 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de
- 20 s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR). Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une dite
- 25 paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) comprend la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une autre dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un
- 30 récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 3' d'une dite paire

35 d'oligonucléotides 3' et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions

d'hybridation que l'acide nucléique correspondant à la première séquence présente dans les conditions i. ci-avant définies.

- 5 Selon une disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et
- 10 un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

- 15 Selon une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et
- 20 un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

- 25 Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.INH correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et
- un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence
- 30 en dérivant.

- Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un
- 35 récepteur p140.INH correspond à un équilibre de quatre oligonucléotides 5', chacun d'eux comprenant la SEQ ID
-

réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et
 5 un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire
 10 d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

15 Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.ACT correspond à un oligonucléotide 5'
 20 comprenant la SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore un autre mode de réalisation
 25 particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- 30 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,
 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence
 35 SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID

paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2D (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Lesdites conditions favorables à l'hybridation de la ou des paires d'oligonucléotides 3' et 5' mises en contact avec l'ADN ou l'ADNc de l'échantillon biologique correspondent avantageusement à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl₂ 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ. De telles conditions sont en particulier présentées dans les exemples.

15

De manière avantageuse, les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du ³²P, permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit échantillon biologique.

De manière également avantageuse, ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN polymérase, telle qu'une Taq polymérase. Des conditions favorables à une telle extension comprennent, outre l'ajout d'ADN polymérase, l'ajout des 4 dNTP (désoxyribonucléoside-triphosphate) en présence d'un tampon de type Tris-HCl.

30

Lesdits hybrides éventuellement formés sont alors, préalablement à leur détection, amplifiés par au moins une PCR (amplification en chaîne par polymérase; cf. les brevets EP 201 184 et EP 200 362) ou RT-PCR dans le cas

~~35 d'ADNc rétrotranscrit à partir d'ARNm. Le cas échéant,~~

Des échantillons biologiques d'origine humaine ou animale particulièrement appropriés à la mise en oeuvre de la méthode selon l'invention comprennent du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des
 5 cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

La méthode selon l'invention peut être notamment
 10 appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

Elle permet ainsi une meilleure prévision :

- de l'acceptation ou de rejet, par un homme ou un
 15 animal, de cellules, d'un tissu ou d'un organe génétiquement différent(es),
- de l'inocuité ou de la pathogénicité (effet GVH), pour un homme ou un animal, d'une greffe ou transplantation, en particulier de cellules, tissu, ou
 20 organe génétiquement différent(es),
- d'un effet potentiel de type GVL que des cellules, un tissu ou un organe génétiquement différent(es) pourraient exercer sur un homme ou animal.

La méthode selon l'invention permet également le
 25 suivi de l'éventuelle apparition de telles réactions après greffe ou transplantation allo- ou xénogénique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la détermination de l'état d'activation de
 30 cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme. Elle permet alors la prévision ou le suivi de l'état de résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une
 35 infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-

Exemple 1 : Documentation du répertoire NKR/contreparties de NKR exprimé par une population de cellules NK humaines (RT-PCR).

5 1. Préparation des ARN

Des préparations ARN ont été réalisées à partir de cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2⁺ et/ou p58.2⁺. La technique immunologique ne permet pas de documenter précisément un tel répertoire : l'anticorps GL183 (Immunotech) reconnaît à la fois le récepteur NKR inhibiteur p58.2 et sa contrepartie activatrice p50.2. Des cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2⁻ et p58.2⁻ à l'aide de l'anticorps GL183 servent de témoins négatifs.

Les préparations ARN sont réalisées comme suit.

15 Extraction

100 µl de Trizol (Gibco BRL catégorie n°15596-026) ont été ajoutés à 10⁶ cellules. On mélange en pipetant plusieurs fois, sans utiliser de mélangeur à vortex. On laisse la solution 5 minutes à température ambiante puis on ajoute 20 µl de chloroforme sans alcool isoamylique. On mélange à nouveau sans utiliser de mélangeur à vortex et on laisse la solution se reposer 5 minutes à température ambiante. On centrifuge alors à 4°C pendant 15 minutes de manière à bien séparer la phase organique inférieure, qui contient l'ADN, de la phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN. On récupère la phase aqueuse sans perturber l'interface entre phase aqueuse et phase organique.

30 Précipitation

50 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse et on laisse l'ARN précipiter pendant 15 minutes à température ambiante. On centrifuge alors pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70%. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (7500 g), on laisse sécher à l'air libre (sans sécher

rapport $R = \frac{G + C}{\text{nombre total de bases}} \times 100$ et de la longueur de
(A+T+G+C)

l'oligonucléotide considéré selon la formule : Température
d'anneau (ou d'hybridation) d'un oligonucléotide =

$$T_m = 69,3 + 0,41(R) - \frac{650}{\text{longueur en pb}} \quad (\text{en } ^\circ\text{C})$$

5

Or, dans une réaction de type amplification en chaîne par polymérase les oligonucléotides d'une même paire doivent pouvoir tous deux s'anneler au récepteur cible dans des conditions de réaction communes, ceci afin de servir

- 10 d'amorces à l'amplification du fragment consensus. Si les oligonucléotides d'une même paire présentent des températures propres d'anneau proches (e.g. 54°C et 56°C), ils pourront s'hybrider au récepteur cible, sans pour autant s'hybrider au récepteur contrepartie
- 15 correspondant, à une température de 54°C ou 55°C.

Si les oligonucléotides d'une même paire présentent par contre des températures propres d'anneau très distantes (e.g. 49°C et 56°C), la réaction d'hybridation au récepteur cible est préférentiellement conduite à la plus

20 basse des deux températures (e.g. 49°C ou 50°C), ce qui permet de maintenir la reconnaissance de sa cible nucléotidique par l'oligonucléotide dont la température propre d'anneau est la plus basse. Dans cette situation, une diminution de spécificité peut toutefois intervenir :

- 25 il peut être observé que certaines paires d'oligonucléotides parviennent, dans de telles conditions de température, à s'hybrider au récepteur-contrepartie du récepteur cible. Une manière de remédier à cette perte de spécificité consiste à augmenter la longueur de
- 30 l'oligonucléotide dont la température propre d'anneau est la plus basse, sans faire perdre à la paire d'oligonucléotides considérée sa spécificité.
-

généralement comprise entre 45°C et 70°C,
préférentiellement entre 50°C et 65°C.

10 µl des produits issus de l'amplification par RT-PCR sont
5 résolus par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en
parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).
Les résultats sont illustrés sur les figures 1A et 1B

La figure 1 illustre l'amplification par PCR après RT
10 (transcription enzymatique inverse) des séquences codantes
pour p58.2 et p50.2 de cellules NK humaines.

En figure 1A est illustrée le résultat de la résolution
électrophorétique des produits issus de l'amplification par
15 RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon
l'invention (cf. tableau 1) avec les populations ADNc de
cellules NK humaines phénotypées p50.2⁺ et p58.2⁺ (piste +)
à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc
de cellules NK humaines phénotypées p50.2⁻ et p58.2⁻
20 (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M,
sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

En figure 1B, est illustrée le résultat de la résolution
électrophorétique des produits issus de l'amplification par
25 RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces C selon
l'invention (cf. tableau 1) avec les populations ADNc de
cellules NK humaines phénotypées p50.2⁺ et p58.2⁺ (piste +)
à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc
de cellules NK humaines phénotypées p50.2⁻ et p58.2⁻
30 (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M,
sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

Il peut observé que les paires d'oligonucléotides C et D
selon l'invention permettent de reconnaître respectivement
35 un phénotype, respectivement, p58.2⁺ et p50.2⁺, en
reconnaissant un fragment de, respectivement, 653 pb et

ambiante en mélangeant de temps en temps et on centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g).

Le culot est mis à sécher brièvement sous vide (1 à 2 µg d'ADN environ sont obtenus) et est remis en suspension dans 10 µl de NaOH 8mM. En cas de présence de matériel insoluble, on microcentrifuge 10 minutes à température ambiante. On transfère le surnageant dans un nouveau tube. Le pH est neutralisé en ajoutant 1,25 µl d'Hepes 0,1 M pour 10 µl.

10

2 - Préparation des paires d'oligonucléotides

Les paires d'oligonucléotides sont préparées comme décrit en exemple 1. Sont ici rapportés les résultats relatifs à la paire D d'oligonucléotides (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') selon l'invention (cf. tableau 1 ci-dessous).

3 - Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

L'amplification en chaîne par polymérase est réalisée comme décrit en exemple 1 en mettant en contact les préparations d'ADN génomiques obtenues avec des paires d'oligonucléotides D servant alors d'amorces.

Les produits issus de l'amplification sont résolus sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats de résolution électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des produits issus de la PCR sont illustrés par la figure 2.

La figure 2 illustre l'amplification par PCR de la séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de

splénocytes de souris transgéniques p50.2' : y est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits

Tableau 1

Paire d'oligo	Molécule	Fonction	Tm	Nom de l'oligo	Séquence de l'oligo (5'-->3')	Séquence	Oligo 5'
A	p58. EB6 (p58. 1)	Inhibiteur	56°C 54°C	p58. 1 FOR ITIM N-term BACK	AGTCGCATGACGCAAGAC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°1 Seq ID N°5, 2, 6, 7	
B	p50. EB6 (p50. 1)	Activateur	56°C 49°C	p58. 1 FOR TM-ACT BACK	AGTCGCATGACGCAAGAC GATGGTGAAGGGGATTTT	Seq ID N°1 Seq ID N°3	
C	p58. 183 (p58. 2)	Inhibiteur	56°C 54°C	p58. 2 FOR ITIM N-term BACK	GGTCCCATGATGCAAGAC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°4 Seq ID N°5, 2, 6, 7.	
D	p50. 183 (p50. 2)	Activateur	56°C 49°C	p58. 2 FOR TM-ACT BACK	GGTCCCATGATGCAAGAC GATGGTGAAGGGGATTTT	Seq ID N°8 Seq ID N°3	
E	p70. INH	Inhibiteur	58°C 54°C	p70. PRO ITIM N-term BACK	CCCGTGGTGATCATGGTC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°9 Seq ID N°5, 2, 6, 7.	
F	p70. ACT	Activateur	58°C 49°C	p70. FOR TM-ACT BACK	CCCGTGGTGATCATGGTC GATGGTGAAGGGGATTTT	Seq ID N°9 Seq ID N°3	
G	p140. INH	Inhibiteur	56°C 58°C	ITIM N-term. FOR Ext C-term BACK	GTGAC (A/G) TAC (A/G) CACAGTTG ACCTGACTGTGGTGCTCG	Seq ID N°10, 11, 12, 13 Seq ID N°14	

TABLEAU 2

Paire d'oligonucléotides	nom du CDNA	Numéro d'accès sur Genbank
A	cl-42	U24076
	NKAT-I	L41267
	cl-47.11	U24078
B	X98858	X98585
	X98892	X98892
	NKAT-7AA	L76670
	NKAT-9AA	L76672
C	cl-43	U24075
	NKAT-6AA	L76669
	NKAT-2 BA	L76663
	cl-6	U24074
	NKAT-2	L41268
	KIR-023GB	U73395
	NKAT-2AB	L76662
D	NKAT-3DA	L76664
	cl-49	U24079
	NKAT-5	L41347
	X89893	X89893
	cl-39	U24077
	NKAT-8	L76671
E	NKAT-5DA	L76667
	X94262	X94262
	NKAT-3	L41269
	NKEX-1	U31416
	NKEX-2	U33328
	KIR-103AS	U71199
	KIR-103AST	U73394
	cl-1.1	X94373
	cl-11	U30274
	cl-2	U30273

LISTE DE SEQUENCES

1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I.N. S. E. R. M.
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Méthode de documentation en immunorécepteurs
et en immunorécepteurs contreparties de NKR

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 27

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OE)

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p58.1 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGTCGCATGA CGCAAGAC

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAACTGTGTA TATGTCAC

18

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p70.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCGTGGTGA TCATGGTC

18

11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GTGACATACA CACAGTTG

18

(12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: Ext C-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

ACCTGACTGT GGTGCTCG

18

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p140. FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ACCTACAGAT GTTATGGTTC TGTT

24

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A. FOR

- (A) LONGUEUR 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2C.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AGTAAACAAA GAGGAACCTT C

21

21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AGCAAAGAGG ACCAGGATT A

21

22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D.BACK

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: 5' Actine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

TACCACTGGC ATCGTGATGG ACT

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 23 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: 3' Actine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

TCCTTCTGCA TCCTGTCGGC AAT

23

REVENDECATIONS

1. Méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :

i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl₂ 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR, contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,

ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un

~~excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3'~~

Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
- 10 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
 - 15 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
 - 20 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
 - 25 - au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- 35 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun
5 couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du ^{32}P , permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNC dudit échantillon biologique.

10

9. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par
15 ADN polymérase.

10. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par au moins une PCR
20 préalablement à leur détection.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par "Nested PCR"
25 (double PCR emboîtée).

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la
30 résolution sur gel de polyacrylamide du mélange réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

35 13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la

précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi, pour un homme ou un animal, d'un effet de type GVL de la part de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

5

20. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme.

10

21. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'état de résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle

15

qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques.

20

22. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies

25 tumorales.

30

23. Kit pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend, dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

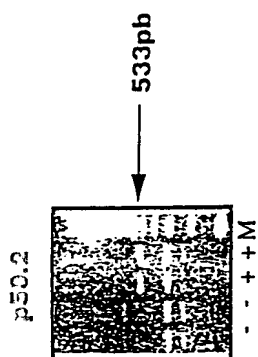


FIGURE 2